



ΕΦΗΜΕΡΙΣ ΤΗΣ ΚΥΒΕΡΝΗΣΕΩΣ

ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑΣ

ΤΕΥΧΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ Αρ. Φύλλου **443**

11 Ιουνίου 1996

ΥΠΟΥΡΓΙΚΕΣ ΑΠΟΦΑΣΕΙΣ & ΕΓΚΡΙΣΕΙΣ

Αριθ. Υ6/2549

*2η Συμπλήρωση της κοινής υπουργικής απόφασης Α6/11335/27.12.85 «Εφαρμογή Κοινοτικών Πράξεων που αφορούν καλλυντικά προϊόντα» με σκοπό την εναρμόνιση της Ελληνικής Νομοθεσίας καλλυντικών προϊόντων, προς την Κοινοτική Οδηγία 95/32/ΕΚ της Επιτροπής σχετικά με τις μεθόδους αναλύσεως που είναι απαραίτητες για τον έλεγχο της συνθέσεως, των καλλυντικών προϊόντων. (Αναδημοσίευση).

ΟΙ ΥΠΟΥΡΓΟΙ
ΕΘΝΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ

Έχοντας υπόψη:

1. Τις διατάξεις:

α) Του άρθρ. 1 και 3 του Ν. 1338/83 «Εφαρμογή του Κοινοτικού Δικαίου» (ΦΕΚ 34/Α'/83) όπως τροποποιήθηκε από το άρθρο 6 του Ν. 1440/84 (ΦΕΚ 70/Α'/84) «Συμμετοχή της Ελλάδος στο κεφάλαιο, στα αποθεματικά και στις προβλέψεις της Ευρωπαϊκής Τράπεζας Επενδύσεων, στο Κεφάλαιο της Ευρωπαϊκής Κοινότητας Άνθρακος και Χάλυβος του Οργανισμού Εφοδιασμού της EURATOM καθώς και του άρθρ. 65 του Ν. 1892/90» (ΦΕΚ Α'/101/90) για τον εκσυγχρονισμό και την ανάπτυξη και άλλες διατάξεις:

β) Των άρθρων 2 παρ. 2 περ. 1α και 14 του Ν. 1316/83 «Ίδρυση Οργάνωσης και αρμοδιότητες του Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων (ΕΟΦ) της Εθνικής Φαρμακοβιομηχανίας (ΕΦ) της Κρατικής Φαρμακαποθήκης (ΚΦ) και τροποποίηση της Φαρ/κής Νομοθεσίας και άλλες διατάξεις» (ΦΕΚ 3/Α'/11.1.83) όπως τροποποιήθηκε και συμπληρώθηκε με τις διατάξεις του Ν. 1965/91 (ΦΕΚ Α'/146/26.9.91).

2. Την οδηγία 95/32/ΕΚ (Ε.Ε.Ε.Κ. αριθ. L.178/20/28.2.95) για τις μεθόδους ελέγχου της συνθέσεως καλλυντικών προϊόντων.

3. Την υπ' αριθ. 0-118/5.2.96 εισήγηση του ΔΣ/ΕΟΦ.

4. Την υπ' αριθ. ΔΥ3α/οικ.158/96 κοινή απόφαση του Πρωθυπουργού και του Υπουργού Υγείας και Πρόνοιας «Ανάθεση αρμοδιοτήτων στους Υφυπουργούς Υγείας και Πρόνοιας Φραγκλίνο Παπαδέλλη και Θεόδωρο Κοτσώνη» (ΦΕΚ 59/Β/29.1.96).

5. Το άρθρο 29Α του Ν. 1558/85 (ΦΕΚ Α'/137) όπως προστέθηκε με το άρθρο 27 του Ν. 2081/92 (ΦΕΚ Α'/154) και το γεγονός ότι από την παρούσα απόφαση δεν προκαλείται δαπάνη σε βάρος του Κρατικού Προϋπολογισμού, αποφασίζουμε:

Άρθρο 1
Σκοπός

Με τις διατάξεις της παρούσας υπουργικής απόφασης, συμπληρώνεται η υπουργ. απόφαση Α6Γ/1135/27.12.85 (ΦΕΚ Β'/105/86) σε συμμόρφωση προς την οδηγία 95/32/ΕΚ (ΕΕΕΚ αριθ. L.178/20/28.2.95) της Επιτροπής σχετικά με τις μεθόδους αναλύσεως που είναι αποφοίτους για τον έλεγχο της συνθέσεως καλλυντικών προϊόντων.

Άρθρο 2

Για τον έλεγχο της συνθέσεως των καλλυντικών προϊόντων και ειδικότερα ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό των κατωτέρω αναφερομένων συστατικών εφαρμόζονται οι μέθοδοι ελέγχου που περιγράφονται στο παράρτημα που ακολουθεί και αποτελεί αναπόσπαστο μέρος της παρούσας απόφασης.

Συστατικά:

1) Βενζοϊκό οξύ
2) 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ
3) σορβικό οξύ
4) σαλικυλικό οξύ
5) προπιονικό οξύ
6) υδροκινόνη
7) μονομεθυλαιθέρας της υδροκινόνης
8) μονοαιθυλαιθέρας της υδροκινόνης
9) μονοβενζυλαιθέρας της υδροκινόνης

Άρθρο 3

Η ισχύς της παρούσας απόφασης αρχίζει από τις 30 Σεπτεμβρίου 1996.

Η απόφαση αυτή να δημοσιευθεί στην Εφημερίδα της Κυβερνήσεως.

Αθήνα, 8 Μαΐου 1996

ΟΙ ΥΠΟΥΡΓΟΙ

ΕΘΝΙΚΗΣ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ	ΥΦΥΠ. ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ
ΓΙΑΝΝΟΣ ΠΑΠΑΝΤΩΝΙΟΥ	**ΦΡΑΓΚΛ. ΠΑΠΑΔΕΛΛΗΣ**

(* Αναδημοσιεύεται λόγω ελλιπούς δημοσιεύσεως στο ΦΕΚ Β'/361/20.5.96).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

I. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ, ΤΟΥ 4-ΥΔΡΟΞΥ-ΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ, ΤΟΥ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΑ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος εφαρμόζεται για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των οξέων: βενζοϊκού, 4-υδροξυβενζοϊκού, σορβικού, σαλικυλικού και προπιονικού στα καλλυντικά. Ο ποιοτικός προσδιορισμός αυτών των συντηρητικών, ο ποσοτικός προσδιορισμός του 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος, του σαλικυλικού οξέος, του σορβικού οξέος και του βενζοϊκού οξέος και ο ποσοτικός προσδιορισμός του προπιονικού οξέος περιγράφονται σε χωριστά κεφάλαια.

2. **Ορισμός**

Η περιεκτικότητα σε βενζοϊκό οξύ, 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, σαλικυλικό οξύ, σορβικό οξύ και προπιονικό οξύ όπως προσδιορίζεται με την παρούσα μέθοδο, εκφράζεται σε ποσοστό επί τοις εκατό κατά μάζα ελευθέρων οξέων.

Α. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

1. **Αρχή της μεθόδου**

Ύστερα από εκχύλιση των συντηρητικών σε όξινο/αλκαλικό περιβάλλον, το εκχύλισμα υποβάλλεται σε ανάλυση με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) με χρησιμοποίηση σχηματισμού παραγώγων επί της πλάκας. Ανάλογα με τα αποτελέσματα, ο ποιοτικός προσδιορισμός επιβεβαιώνεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ή αέριο χρωματογραφία (GC) στην περίπτωση του προπιονικού οξέος.

2. **Αντιδραστήρια**

2.1. Γενικά

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας. Το χρησιμοποιούμενο νερό να είναι απεσταγμένο ή ισοδύναμης τουλάχιστον καθαρότητας.

2.2. Ακετόνη

2.3. Διαιθυλαιθέρας

2.4. Ακετονιτρίλιο

2.5. Τολουόλιο

2.6. n-Εξάνιο

2.7. Υγρή παραφίνη

2.8. Υδροχλωρικό οξύ 4M

2.9. Υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου 4M

2.10. Χλωριούχο ασβέστιο, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

2.11. Ανθρακικό λίθιο, Li_2CO_3

2.12. 2-Βρωμο-2'-ακετοναφθόνη

2.13. 4-Υδροξυβενζοϊκό οξύ

2.14. Σαλικυλικό οξύ

2.15. Βενζοϊκό οξύ

2.16. Σορβικό οξύ

2.17. Προπιονικό οξύ

2.18. Διαλύματα αναφοράς

Παρασκευάζονται διαλύματα συγκεντρώσεως 0,1 % (m/v) (100 mg/100 ml) από καθένα από τα τέσσερα συντηρητικά (2.13 έως 2.17) σε διαιθυλαιθέρα.

2.19. Αντιδραστήριο σχηματισμού παραγώγων

Διάλυμα 50 mg 2-βρωμο-2-ακετοναφθόνης (2.12) σε 10 ml ακετοτριλίου (2.4). Το διάλυμα αυτό πρέπει να παρασκευάζεται κάθε εβδομάδα και να φυλάσσεται στο ψυγείο.

2.20. Διάλυμα καταλύτη

Διάλυμα ανθρακικού λιθίου (2.11), συγκεντρώσεως 0,3 % (m/v) (300 mg/100 ml), σε νερό. Το διάλυμα πρέπει να είναι πρόσφατα παρασκευασμένο.

2.21. Διαλύτης αναπτύξεως

Τολουόλιο (2.5)/Ακετόνη (2.2) (20: 0,5, n/n)

2.22. Παραφίνη (2.7)/n — Εξάνιο (2.6) (1: 2, n/n)

3. Εξοπλισμός

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός

3.1. Υδατόλουτρο θερμορυθμιζόμενο στους 60 °C

3.2. Θάλαμος αναπτύξεως

3.3. Πηγή υπεριώδους φωτός μήκους κύματος 254 και 366 nm

3.4. Πλάκες λεπτής στοιβάδας Kieselgel 60, χωρίς δείκτη φθορισμού, διαστάσεων 20 cm × 20 cm, πάχους στοιβάδας 0,25 mm, με συμπηκνωμένη ζώνη 2,5 × 20 cm (Merck 11845 ή ανάλογες)

3.5. Μικροσύριγγα των 10 μl

3.6. Μικροσύριγγα των 25 μl

3.7. Πυριαντήριο με θερμοστάτη για θερμοκρασίες μέχρι 105 °C

3.8. Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 50 ml με βιδωτό πώμα

3.9. Διηθητικό χαρτί Schleicher & Schull, Weissband αριθ. 5892 ή ανάλογο, διαμέτρου 90 mm

3.10. Πεχαμετρικό χαρτί Universal: pH 1-11

3.11. Γυάλινα φιαλίδια δειγμάτων των 5 ml

3.12. Περιστρεφόμενος εξατμιστής (Rotavapor ή ανάλογος)

3.13. Θερμαντική πλάκα

4. **Διαδικασία**

4.1. Προπαρασκευή του δείγματος

Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα των 50 ml με βιδωτό πώμα (3.8), ζυγίζεται περίπου 1 g δείγματος, προστίθενται τέσσερις σταγόνες υδροχλωρικού οξέος 4M (2.8) και 40 ml ακετόνης (2.2). Προκειμένου για ισχυρώς αλκαλικά προϊόντα, όπως το σαπούνι τουαλέτας, πρέπει να προστεθούν 20 σταγόνες υδροχλωρικού οξέος 4M (2.8). Ελέγχεται το pH ώστε να είναι περίπου 2 με πεχαμετρικό χαρτί (3.10). Ο σωλήνας πωματίζεται και ανακινείται ζωηρά ένα λεπτό.

Αν είναι αναγκαίο, για να διευκολυνθεί η εκχύλιση των συντηρητικών στην ακετονική φάση, το μείγμα θερμαίνεται ήπια μέχρι τους 60 °C περίπου, ώστε να τακεί η λιπαρή φάση.

Το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου και διηθείται με χάρτινο ηθμό (3.9) σε κωνική φιάλη.

Σε κωνική φιάλη των 200 ml μεταγγίζονται 20 ml του διηθήματος, προστίθενται 20 ml νερού και το σύνολο αναμειγνύεται. Ρυθμίζεται το pH του μείγματος στην τιμή περίπου 10 με διάλυμα υδροξειδίου του καλίου 4M (2.9). Για τη μέτρηση του pH χρησιμοποιείται πεχαμετρικό χαρτί (3.10).

Προστίθεται κατόπιν 1 g χλωριούχου ασβεστίου (2.10) και το σύνολο ανακινείται ζωηρά. Ακολουθεί διήθηση με χάρτινο ηθμό (3.9) σε διαχωριστική χοάνη των 250 ml, που ήδη περιέχει 75 ml διαιθυλαιθέρα (2.3). Η χοάνη ανακινείται ζωηρά επί ένα λεπτό και έπειτα αφήνεται σε ηρεμία για να διαχωριστούν οι στοιβάδες. Η υδατική στοιβάδα μεταγγίζεται σε κωνική φιάλη των 250 ml ενώ η αιθερική απορρίπτεται. Με τη βοήθεια πεχαμετρικού χαρτιού (3.10), ρυθμίζεται το pH του υδατικού διαλύματος στην τιμή περίπου 2 με υδροχλωρικό οξύ 4M (2.8). Στη συνέχεια προστίθενται 10 ml διαιθυλαιθέρα (2.3) πωματίζεται η φιάλη και ανακινείται ζωηρά επί ένα λεπτό. Αφήνεται σε ηρεμία για να διαχωριστούν οι στοιβάδες και η αιθερική στοιβάδα μεταγγίζεται σε περιστρεφόμενο εξατμιστή (3.12). Η υδατική στοιβάδα απορρίπτεται.

Η αιθερική στοιβάδα εξατμίζεται και το υπόλειμμα διαλύεται σε 1 ml διαιθυλαιθέρα (2.3). Το λαμβανόμενο διάλυμα μεταγγίζεται σε φιαλίδιο δειγμάτων (3.11)

4.2. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Για κάθε διάλυμα αναφοράς και διάλυμα δείγματος που πρόκειται να υποβληθεί σε χρωματογραφία, τοποθετούνται με σύριγγα (3.5) περίπου 3 μl διαλύματος ανθρακικού λιθίου (2.20) σε ισαπέχοντα σημεία της γραμμής εκκινήσεως στη συμπηκνωμένη ζώνη μιας πλάκας TLC (3.4). Η πλάκα ξηραίνεται σε ρεύμα ψυχρού αέρα.

Η πλάκα TLC τοποθετείται σε θερμαντική πλάκα (3.13) που έχει θερμανθεί στους 40 °C, ώστε οι κηλίδες να παραμείνουν όσο το δυνατόν μικρότερες. Με τη βοήθεια μικροσύριγγας (3.5), τοποθετούνται 10 μl από κάθε διάλυμα αναφοράς (2.18) και διάλυμα δείγματος (4.1) στη γραμμή εκκινήσεως στην πλάκα, ακριβώς στα σημεία όπου έχει τοποθετηθεί το διάλυμα του ανθρακικού λιθίου.

Τέλος τοποθετούνται στην πλάκα περίπου 15 μl αντιδραστηρίου σχηματισμού παραγώγων (2.19) (διάλυμα 2-βρωμο-2-ακετοναφθόνης), και πάλι ακριβώς πάνω στις ίδιες κηλίδες που έχουν τοποθετηθεί τα διαλύματα αναφοράς/δείγματος και το διάλυμα ανθρακικού λιθίου.

Η πλάκα TLC θερμαίνεται σε πυριαντήριο (3.7) στους 80 °C για 45 λεπτά. Αφού ψυχθεί, η πλάκα, τοποθετείται για ανάπτυξη του χρωματογραφήματος σε θάλαμο αναπτύξεως (3.2) που έχει αφεθεί σε ηρεμία για 15 λεπτά (στον οποίο δεν έχει τοποθετηθεί εσωτερικά διηθητικό χαρτί), με το διαλύτη αναπτύξεως (2.21) (τολουόλιο/ακετόνη), μέχρι το μέτωπο του διαλύτη να διανύσει απόσταση 15 cm (απαιτούμενος χρόνος περίπου 80 λεπτά).

Η πλάκα ξηραίνεται σε ψυχρό ρεύμα αέρα και έπειτα γίνεται η εμφάνιση των κηλίδων σε λάμπα υπεριώδους φωτός (3.3). Για να ενταθεί ο φθορισμός των ασθενών κηλίδων, η πλάκα TLC μπορεί να εμβαπτισθεί σε μείγμα παραφίνης/n-εξανίου (2.22).

5. **Ποιοτικός προσδιορισμός**

Για κάθε κηλίδα υπολογίζεται η τιμή του συντελεστή Rf.

Οι τιμές Rf και η συμπεριφορά του δείγματος στην υπεριώδη ακτινοβολία συγκρίνονται με τα αντίστοιχα δεδομένα για τα διαλύματα αναφοράς. Μπορούμε να συναγάγουμε προκαταρκτικά συμπεράσματα για την παρουσία και την ταυτότητα των συντηρητικών που υπάρχουν. Εκτελούμε την HPLC που περιγράφεται στο κεφάλαιο Β, ή όταν φαίνεται ότι υπάρχει προπιονικό οξύ, την GC που περιγράφεται στο κεφάλαιο Γ. Συγκρίνουμε τους χρόνους κατακράτησης που προκύπτουν για το δείγμα με τους αντίστοιχους χρόνους των διαλυμάτων αναφοράς.

Ο τελικός ποιοτικός προσδιορισμός των συντηρητικών που περιέχει το δείγμα επιτυγχάνεται με συνδυασμό των αποτελεσμάτων από την TLC και την HPLC ή GC.

Β. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΤΟΥ 4-ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ, ΤΟΥ ΣΟΡΒΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΑΛΙΚΥΛΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

1. **Αρχή της μεθόδου**

Το δείγμα, αφού οξινισθεί, εκχυλίζεται με μείγμα αιθανόλης και νερού. Μετά από διήθηση, τα συντηρητικά προσδιορίζονται ποσοτικά με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

2. **Αντιδραστήρια**

2.1. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας. Το χρησιμοποιούμενο νερό είναι απεσταγμένο ή ισοδύναμης τουλάχιστον καθαρότητας.

2.2. Απόλυτη αιθανόλη

2.3. 4-Υδροξυ-βενζοϊκό οξύ

2.4. Σαλικυλικό οξύ

2.5. Βενζοϊκό οξύ

2.6. Σορβικό οξύ

2.7. Οξικό νάτριο με 3 μόρια H_2O ($CH_3COONA \cdot 3H_2O$)

2.8. Οξικό οξύ, $d_4^{20} = 1,05$ g/ml

2.9. Ακετονιτρίλιο

2.10. Θειικό οξύ 2M

2.11. Υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του καλίου 0.2M

2.12. 2-Μεθοξυ-βενζοϊκό οξύ

2.13. Μείγμα αιανόλης/νερού: 9 όγκοι αιθανόλης (2.2) αναμειγνύονται με 1 όγκο νερού (2.1)

2.14. Διάλυμα εσωτερικού προτύπου

Παρασκευάζεται διάλυμα περιεκτικότητας περίπου 1 g 2-μεθοξυ-βενζοϊκού οξέος (2.12) ανά 500 ml μείγματος αιθανόλης/νερού (2.13).

2.15. Κινητή φάση για την HPLC

2.15.1. Ρυθμιστικό διάλυμα: σε 1 λίτρο νερού προστίθενται 6.35 g οξικού νατρίου (2.7) και 20.0 ml οξικού οξέος (2.8) και αναμειγνύονται.

2.15.2. Η κινητή φάση παρασκευάζεται με ανάμειξη 9 όγκων οξικού ρυθμιστικού διαλύματος (2.15.1) και 1 όγκου ακετονιτριλίου (2.9).

2.16. Μητρικό διάλυμα συντηρητικών

Σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml, ζυγίζονται με ακρίβεια περίπου 0.05 g 4-υδροξυβενζοϊκού οξέος (2.3), 0.2 g σαλικυλικού οξέος (2.4), 0.2 g βενζοϊκού οξέος (2.5) και 0.05 g σορβικού οξέος (2.6) και ο όγκος συμπληρώνεται έως τη χαραγή με μείγμα αιθανόλης/νερού (2.13). Το διάλυμα φυλάσσεται στο ψυγείο και είναι σταθερό μια εβδομάδα.

2.17. Πρότυπα διαλύματα συντηρητικών

Από το μητρικό διάλυμα (2.16) λαμβάνονται ποσότητες 8.00, 4.00, 2.00, 1.00 και 0.50 ml και φέρονται σε ισάριθμες ογκομετρικές φιάλες των 20 ml. Προστίθενται 10.00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (2.14), 0.5 ml θειικού οξέος 2M (2.10) και ο όγκος συμπληρώνεται έως τη χαραγή με μείγμα αιθανόλης/νερού (2.13). Τα διαλύματα αυτά πρέπει να έχουν παρασκευαστεί πρόσφατα.

3. **Εξοπλισμός**

Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός εκτός εάν καθορίζεται διαφορετικά και:

3.1. Υδατόλουτρο ρυθμισμένο στους 60 °C.

3.2. Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους φωτός μεταβλητού μήκους κύματος και βρόχο έγχυσης 10 μl

3.3. Στήλη:

από ανοξείδωτο χάλυβα, μήκους 12.5-25 cm, εσωτερικής διαμέτρου 4.6 mm, που έχει πληρωθεί με Nucleosil 5C18 ή ανάλογο προσροφητικό υλικό.

3.4. Διηθητικό χαρτί Schleicher και Schull, Weissband αριθ. 5892 ή ανάλογο, διαμέτρου 90 mm

3.5. Γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 50 ml με βιδωτό πώμα

3.6. Γυάλινα φιαλίδια δειγμάτων των 5 ml

3.7. Σφαιρίδια βρασμού από ανθρακοπυρίτιο, διαμέτρου 2-4 mm ή ανάλογα.

4. **Διαδικασία**

4.1. Προπαρασκευή του δείγματος

4.1.1. Προπαρασκευή δείγματος χωρίς εσωτερικό πρότυπο

Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα των 50 ml με βιδωτό πώμα (3.5) ζυγίζεται 1 g δείγματος. Στο σωλήνα φέρονται με σιφώνιο 1.00 ml θειικού οξέος 2M (2.10) και 40.0 ml μείγματος αιθανόλης/νερού (2.13). Προστίθενται περίπου 1 g σφαιρίδια βρασμού (3.7) ο σωλήνας πωματίζεται και αναχινείται ζωηρά επί ένα λεπτό τουλάχιστον, μέχρι να ληφθεί ομοιογενές εναιώρημα. Ο σωλήνας τοποθετείται για 5 λεπτά ακριβώς σε υδατόλουτρο (3.1) του οποίου η θερμοκρασία έχει ρυθμιστεί στους 60 °C, για να διευκολυνθεί η εκχύλιση των συντηρητικών στην αιθανολική φάση.

Ο σωλήνας ψύχεται αμέσως με τρεχούμενο κρύο νερό και το εκχύλισμα αφήνεται σε ηρεμία στους 5 °C για μία ώρα.

Ακολουθεί διήθηση του εκχυλίσματος με διηθητικό χαρτί (3.3). Περίπου 2 ml του εκχυλίσματος μεταγγίζονται σε φιαλίδιο δειγμάτων (3.6). Το εκχύλισμα φυλάσσεται στους 5 °C και ο ποσοτικός προσδιορισμός με HPLC εκτελείται μέσα σε 24 ώρες μετά την παρασκευή του.

4.1.2. Προπαρασκευή του δείγματος με εσωτερικό πρότυπο

Σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα των 50 ml με βιδωτό πώμα (3.5), ζυγίζονται με ακρίβεια 3 δεκαδικών ψηφίων 1 g ± 0.1 g (Α γραμμάρια) δείγματος. Στο σωλήνα προστίθενται με σιφώνιο 1.00 ml του θειικού οξέος 2M (2.10) και 30.0 ml μείγματος αιθανόλης/νερού (2.13). Προστίθενται περίπου 1 g σφαιρίδια βρασμού(3.7) και 10.00 ml διαλύματος εσωτερικού προτύπου (2.14). Ο σωλήνας πωματίζεται και αναχινείται ζωηρά ένα λεπτό τουλάχιστον μέχρι να ληφθεί ομοιογενές εναιώρημα. Ο σωλήνας τοποθετείται για 5 λεπτά ακριβώς σε υδατόλουτρο (3.1) του οποίου η θερμοκρασία έχει ρυθμιστεί στους 60 °C, για να διευκολυνθεί η εκχύλιση των συντηρητικών στην αιθανολική φάση.

Ο σωλήνας ψύχεται αμέσως με τρεχούμενο κρύο νερό και το εκχύλισμα αφήνεται σε ηρεμία στους 5 °C για μία ώρα.

Ακολουθεί διήθηση του εκχυλίσματος με διηθητικό χαρτί (3.4). Περίπου 2 ml του διηθήματος μεταγγίζονται σε φιαλίδιο δειγμάτων (3.6). Το εκχύλισμα φυλάσσεται στους 5 °C και ο ποσοτικός προσδιορισμός με HPLC εκτελείται μέσα σε 24 ώρες από την παρασκευή του.

4.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο/ρυθμιστικό διάλυμα οξικών ιόντων (2.15).

Η ταχύτητα ροής της κινούμενης φάσης μέσω της στήλης ρυθμίζεται στα 2.0 ml/λεπτό ± 0.5 ml/λεπτό και το μήκος κύματος του ανιχνευτή ρυθμίζεται στα 240 nm.

4.2.1. Βαθμονόμηση

Εισάγονται στον υγρό χρωματογράφο (3.2) 10 μl από κάθε πρότυπο διάλυμα συντηρητικών (2.17). Από τα λαμβανόμενα χρωματογραφήματα προσδιορίζονται οι λόγοι των υψών των κορυφών που αντιστοιχούν στα υπό ανάλυση συντηρητικά προς το ύψος της κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο. Για κάθε συντηρητικό σχεδιάζεται καμπύλη που παριστά τους λόγους αυτούς συναρτήσει της συγκεντρώσεως κάθε προτύπου διαλύματος.

Εξακριβώνεται ότι κατά τη διαδικασία αυτή η σχέση που λαμβάνεται για τα πρότυπα διαλύματα είναι γραμμική.

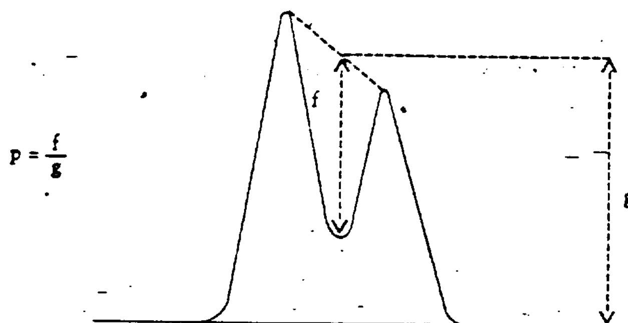
4.2.2. Προσδιορισμός

Εισάγονται στον υγρό χρωματογράφο (3.2) 10 μl από το εκχύλισμα του δείγματος (4.1.1) και καταγράφεται το χρωματογράφημα. Εισάγονται 10 μl προτύπου διαλύματος συντηρητικών (2.17) και καταγράφεται το χρωματογράφημα. Τα δύο χρωματογραφήματα συγκρίνονται. Αν στο χρωματογράφημα του εκχυλίσματος (4.1.1) δεν εμφανίζεται κορυφή με τον ίδιο περίπου χρόνο κατακράτησης που αντιστοιχεί στο 2-μεθοξυ-βενζοϊκό οξύ (το συνιστώμενο εσωτερικό πρότυπο), εισάγονται στον υγρό χρωματογράφο 10 μl από το εκχύλισμα του δείγματος, στο οποίο έχει προστεθεί εσωτερικό πρότυπο (4.1.2) και καταγράφεται το χρωματογράφημα.

Αν στο χρωματογράφημα του εκχυλίσματος του δείγματος (4.1.1) παρεμβάλλεται κορυφή με τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με του 2-μεθοξυ-βενζοϊκού οξέος, θα πρέπει να επιλεγεί άλλο, κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο. (Αν από το χρωματογράφημα λείπει κάποιο από τα υπό ανάλυση συντηρητικά, μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτό ως εσωτερικό πρότυπο).

Εξακριβώνεται ότι τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται από πρότυπο διάλυμα και το διάλυμα δείγμα πληρούν τις ακόλουθες απαιτήσεις:

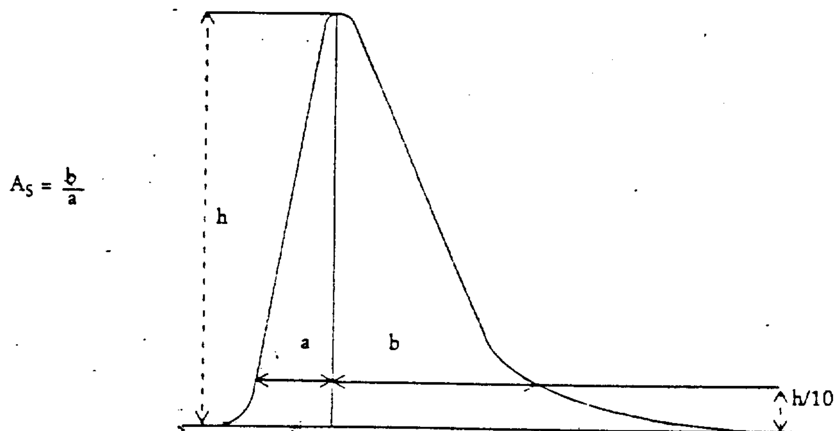
— ο διαχωρισμός των κορυφών προκειμένου για το ζεύγος κορυφών με τον ασαφέστερο διαχωρισμό είναι τουλάχιστον 0.90 (για τον ορισμό του διαχωρισμού των κορυφών βλέπε σχήμα 1).



Σχήμα 1: **Διαχωρισμός των κορυφών**

Εάν δεν επιτυγχάνεται ο απαιτούμενος διαχωρισμός, θα πρέπει είτε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικότερη στήλη είτε να ρυθμιστεί η σύνθεση της κινητής φάσης, έτσι ώστε να ικανοποιείται η απαίτηση.

— ο συντελεστής ασυμμετρίας A_s για όλες τις λαμβανόμενες κορυφές κυμαίνεται μεταξύ 0.9 και 1.5 (για τον ορισμό του συντελεστή ασυμμετρίας κορυφών βλέπε σχήμα 2). Κατά την καταγραφή του χρωματογραφήματος για τον προσδιορισμό του συντελεστή ασυμμετρίας, συνιστάται ταχύτητα χαρτιού 2 cm/λεπτό τουλάχιστον,



Σχήμα 2: **Συντελεστής ασυμμετρίας κορυφών**

— πρέπει να προκύπτει σταθερή γραμμή.

5. **Υπολογισμοί**

Η συγκέντρωση των οξέων συντηρητικών στο εκχύλισμα του δείγματος υπολογίζεται από τους λόγους των υψών των κορυφών που αντιστοιχούν στα υπό ανάλυση συντηρητικά προς το ύψος της κορυφής που προκύπτει για το 2-μεθοξυ-βενζοϊκό οξύ (εσωτερικό πρότυπο), με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς. Η περιεκτικότητα του εκχυλίσματος του δείγματος σε βενζοϊκό οξύ, 4-υδοξυβενζοϊκό οξύ, σορβικό οξύ ή σαλικυλικό οξύ εκφραζόμενη σε εκατοστιαία αναλογία κατά μάζα (x_i), υπολογίζεται με τον τύπο:

$$x_i \ \% \ (m/m) = \frac{100 \cdot 20 \cdot b}{10^6 \cdot a} = \frac{b}{500 \cdot a}$$

a = μάζα (g) του δείγματος δοκιμής (4.1.2).

b = συγκέντρωση (μg/ml) του συντηρητικού στο εκχύλισμα του δείγματος (4.1.2), όπως προκύπτει από την καμπύλη αναφοράς.

6. **Επαναληψιμότητα** (¹)

Για περιεκτικότητα σε 4-υδροξυ-βενζοϊκό οξύ 0,40 %, η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών, που εκτελούνται στο ίδιο δείγμα, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,035 % σε απόλυτες τιμές.

Για περιεκτικότητα σε βενζοϊκό οξύ 0,50 %, η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών, που εκτελούνται στο ίδιο δείγμα, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,050 % σε απόλυτες τιμές.

Για περιεκτικότητα σε σαλικυλικό οξύ 0,50 %, η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών, που εκτελούνται στο ίδιο δείγμα, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,045 % σε απόλυτες τιμές.

Για περιεκτικότητα σε σορβικό οξύ 0,60 %, η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο παράλληλων προσδιορισμών, που εκτελούνται στο ίδιο δείγμα, δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,035 % σε απόλυτες τιμές.

7. **Παρατηρήσεις**

7.1. Τα αποτελέσματα μιας δοκιμής αξιοπιστίας (ruggedness test) στην οποία υποβλήθηκε η μέθοδος έδειξαν ότι η ποσότητα του θειικού οξέος που προστίθεται για την εκχύλιση των οξέων από το δείγμα είναι κρίσιμης σημασίας και κατά συνέπεια η ποσότητα δείγματος που υφίσταται κατεργασία θα πρέπει να βρίσκεται εντός των υποδεικνυομένων ορίων.

7.2. Εφόσον κρίνεται σκόπιμο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλη προστήλη.

Γ. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΠΙΟΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Αυτή η μέθοδος είναι κατάλληλη για τον προσδιορισμό του προπιονικού οξέος με μέγιστη συγκέντρωση 2 % (m/m) σε όλα τα καλλυντικά προϊόντα.

2. **Ορισμός**

Η συγκέντρωση του προπιονικού οξέος που μετριέται με αυτή τη μέθοδο, εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό κατά μάζα (% m/m) του προϊόντος.

3. **Αρχή της μεθόδου**

Ύστερα από κατάλληλη επεξεργασία του προς ανάλυση προϊόντος, ο προσδιορισμός του προπιονικού οξέος γίνεται με αέριο χρωματογραφία και με χρήση του 2-μεθυλοπροπιονικού οξέος ως εσωτερικού προτύπου.

4. **Αντιδραστήρια**

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας· πρέπει να χρησιμοποιείται απεσταγμένο νερό ή νερό ισοδύναμης ποιότητας.

4.1. Αιθανόλη 96 % (v/v)

4.2. Προπιονικό οξύ

4.3. 2-μεθυλοπροπιονικό οξύ

4.4. Ορθοφωσφορικό οξύ 10 % (m/v)

4.5. Διάλυμα προπιονικού οξέος

Ζυγίζουμε με ακρίβεια 1,00 g περίπου (p γραμμάρια) προπιονικού οξέος μέσα σε ογκομετρική φιάλη 50 ml και συμπληρώνουμε με αιθανόλη (4.1) έως τη χαραγή.

4.6. Διάλυμα εσωτερικού προτύπου

Ζυγίζουμε με ακρίβεια 1,00 g περίπου (e γραμμάρια) 2-μεθυλοπροπιονικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη 50 ml και συμπληρώνουμε με αιθανόλη (4.1) έως τη χαραγή.

(¹) ISO 5725.

5. **Εξοπλισμός**

5.1. Συνήθης εργαστηριακός εξοπλισμός και:

5.2. Αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας

5.3. Γυάλινος σωλήνας (20 × 150 mm) με βιδωτό πώμα

5.4. Υδατόλουτρο στους 60 °C

5.5. Γυάλινη σύριγγα των 10 ml με διηθητική μεμβράνη (διάμετρος πόρων 0,45 μm)

6. **Εκτέλεση**

6.1. Προπαρασκευή του δείγματος

6.1.1. Προπαρασκευή του δείγματος χωρίς εσωτερικό πρότυπο

Ζυγίζουμε 1 g περίπου από το δείγμα μέσα σε γυάλινο σωλήνα (5.3) και προσθέτουμε 0,5 ml φωσφορικού οξέος (4.4) και 9,5 ml αιθανόλης (4.1).

Κλείνουμε το σωλήνα και αναχινούμε δυνατά. Αν είναι αναγκαίο, τοποθετούμε το σωλήνα στο υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60 °C (5.4) για 5 λεπτά ώστε να διαλυθεί πλήρως η λιπαρή φάση. Ψύχουμε γρήγορα με τρεχούμενο νερό. Διηθούμε μέρος του διαλύματος μέσω διηθητικής μεμβράνης (5.5). Χρωματογραφούμε το διήθημα την ίδια ημέρα.

6.1.2. Προπαρασκευή του δείγματος με εσωτερικό πρότυπο

Ζυγίζουμε με ακρίβεια τριών δεκαδικών ψηφίων 1 g ± 0,1 g (a γραμμάρια) από το δείγμα μέσα σε γυάλινο σωλήνα (5.3) και προσθέτουμε 0,5 ml φωσφορικού οξέος (4.4), 0,5 ml του διαλύματος εσωτερικού προτύπου (4.6) και 9 ml αιθανόλης (4.1).

Κλείνουμε το σωλήνα και αναχινούμε δυνατά. Αν είναι αναγκαίο, τοποθετούμε το σωλήνα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 60 °C (5.4) για 5 λεπτά ώστε να διαλυθεί πλήρως η λιπαρή φάση. Ψύχουμε γρήγορα με τρεχούμενο νερό. Διηθούμε μέρος του διαλύματος μέσω μεμβράνης (5.5) και χρωματογραφούμε το διήθημα την ίδια ημέρα.

6.2. Συνθήκες για την αέριο χρωματογραφία

Συνιστώνται οι παρακάτω συνθήκες λειτουργίας:

Στήλη

Είδος	ανοξείδωτος χάλυβας
Μήκος	2 m
Διάμετρος	⅛" (~ 3 mm)
Υλικό πληρώσεως	10 % SP™ 1000 (ή ανάλογο) + 1 % H_3PO_4 σε πλέγμα Chromosorb WAW 100-120 mesh

Θερμοκρασία

Είσοδος	200 °C
Στήλη	120 °C
Ανιχνευτής	200 °C

Φέρον αέριο άζωτο

Παροχή 25 ml/min

6.3. Χρωματογραφία

6.3.1. Βαθμονόμηση

Μέσα σε 5 ογκομετρικές φιάλες των 20 ml, μεταφέρουμε με σιφώνιο 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 και 4,00 ml, αντίστοιχα, του διαλύματος του προπιονικού οξέος (4.5). Σε κάθε ογκομετρική φιάλη μεταφέρουμε με σιφώνιο 1,00 ml του διαλύματος εσωτερικού προτύπου (4.6) συμπληρώνουμε έως τη χαραγή με αιθανόλη (4.1) και αναμειγνύουμε. Τα διαλύματα που παρασκευάζονται με τον τρόπο αυτό περιέχουν e mg/ml 2-μεθυλοπροπιονικού οξέος ως εσωτερικό πρότυπο (δηλαδή, 1 mg/ml εάν e = 1,000) και p/4, p/2, p, 2p, 4p mg/ml προπιονικού οξέος (δηλαδή 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 mg/ml εάν p = 1,000).

Εισάγουμε 1 μl από καθένα από αυτά τα διαλύματα στο χρωματογράφο και λαμβάνουμε την καμπύλη αναφοράς με τετμημένη το λόγο των μαζών προπιονικού οξέος/2-μεθυλοπροπιονικού οξέος και τεταγμένη το λόγο των αντίστοιχων εμβαδών.

Κάνουμε τρεις ενέσεις από το κάθε διάλυμα και υπολογίζουμε το μέσο όρο των λόγων των εμβαδών της κορυφής.

6.3.2. Προσδιορισμός

Ενώνουμε 1 μl από το διηθημένο δείγμα 6.1.1. Συγκρίνουμε το χρωματογράφημα με εκείνο του προτύπου διαλύματος (6.3.1). Αν κάποια κορυφή έχει περίπου τον ίδιο χρόνο κατακράτησης με το 2-μεθυλοπροπιονικό οξύ, αλλάζουμε το εσωτερικό πρότυπο. Αν δεν παρατηρούμε κάποια παρεμβολή, ενώνουμε 1 μl από το διηθημένο δείγμα 6.1.2 και μετράμε τα εμβαδά της κορυφής του προπιονικού οξέος και της κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

Κάνουμε τρεις ενέσεις από το κάθε διάλυμα και υπολογίζουμε το μέσο όρο των λόγων των εμβαδών της κορυφής.

7. Υπολογισμοί

7.1. Από την καμπύλη αναφοράς που λάβαμε κατά τη βαθμονόμηση στο σημείο 6.3.1 λαμβάνουμε το λόγο της μάζας (K) που αντιστοιχεί στο λόγο των εμβαδών της κορυφής που υπολογίσαμε στο σημείο 6.3.2.

7.2. Από το λόγο μάζας που λάβαμε έτσι, υπολογίζουμε την περιεκτικότητα σε προπιονικό οξύ ως ποσοστό επί τοις εκατό κατά μάζα χρησιμοποιώντας τον τύπο:

$$x\ \%\ (m/m) = K\frac{0.5 \cdot 100 \cdot e}{50 \cdot a} = K\frac{e}{a}$$

K = όπου: K = λόγος που υπολογίσαμε στο σημείο 7.1.

a = η μάζα σε γραμμάρια του δείγματος που ζυγίσαμε στο σημείο 6.1.2.

e = η μάζα σε γραμμάρια του εσωτερικού προτύπου που ζυγίσαμε στο σημείο 4.6.

Στρογγυλεύουμε τα αποτελέσματα σε 1 δεκαδικό ψηφίο.

8. Επαναληψιμότητα (¹)

Για περιεκτικότητα σε προπιονικό οξύ έως 2 % (m/m) η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο προσδιορισμών που γίνονται παράλληλα στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να ξεπερνά το 0,12 %.

II. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΥΔΡΟΚΙΝΟΝΗΣ, ΤΟΥ ΥΔΡΟΚΙΝΟΝΟ-ΜΟΝΟΜΕΘΥΛΑΙΘΕΡΑ, ΤΟΥ ΥΔΡΟΚΙΝΟΝΟΜΟΝΟΑΙΘΥΛΑΙΘΕΡΑ ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΔΡΟΚΙΝΟΝΟ-ΜΟΝΟΒΕΝΖΥΛΑΙΘΕΡΑ ΣΤΑ ΚΑΛΛΥΝΤΙΚΑ

A. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

1. Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η μέθοδος αυτή περιγράφει την ανίχνευση και τον ποιοτικό προσδιορισμό της υδροκινόνης, του υδροκινονο-μονομεθυλαιθέρα, του υδροκινονο-μονοαιθυλαιθέρα και του υδροκινονο-μονοβενζυλαιθέρα (μονοβενζόνη) στα καλλυντικά προϊόντα για τη λεύκανση του δέρματος.

2. Αρχή

Ο ποιοτικός προσδιορισμός της υδροκινόνης και των αιθέρων της γίνεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).

3. Αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας

(¹) ISO 5725.

3.1. Αιθανόλη 96 % (v/v)

3.2. Χλωροφόρμιο

3.3. Διαιθυλαιθέρας

3.4. Διαλύτης ανάπτυξης:

Χλωροφόρμιο/διαιθυλαιθέρας, 66:33 (v/v)

3.5. Αμμωνία, 25 % m/m (d_4^{20} = 0,91 g/ml)

3.6. Ασκορβικό οξύ

3.7. Υδροκινόνη

3.8. Υδροκινονο-μονομεθυλαιθέρας

3.9. Υδροκινονο-μονοαιθυλαιθέρας

3.10. Υδροκινονο-μονοβενζυλαιθέρας (μονοβενζόνη)

3.11. Διαλύματα αναφοράς

Τα ακόλουθα διαλύματα αναφοράς πρέπει να έχουν παρασκευαστεί προσφάτως, και είναι σταθερά για μία ημέρα.

3.11.1. Ζυγίζονται 0,05 g υδροκινόνης (3.7) μέσα σε βαθμολογημένο δοκιμαστικό σωλήνα των 10 ml. Προστίθενται 0,250 g ασκορβικού οξέος (3.6) και 5 ml αιθανόλης (3.1). Προστίθεται αμμωνία (3.5) μέχρι το pH να γίνει 10 και συμπληρώνεται ο υπόλοιπος όγκος με αιθανόλη (3.1).

3.11.2. Ζυγίζονται 0,05 g υδροκινονο-μονομεθυλαιθέρα (3.8) μέσα σε βαθμολογημένο δοκιμαστικό σωλήνα των 10 ml. Προστίθενται 0,250 g ασκορβικού οξέος (3.6) και 5 ml αιθανόλης (3.1). Προστίθεται αμμωνία (3.5) μέχρι το pH να γίνει 10 και συμπληρώνεται έως τη χαραγή με αιθανόλη (3.1).

3.11.3. Ζυγίζονται 0,05 g υδροκινονο-μονοαιθυλαιθέρα (3.9) μέσα σε βαθμολογημένο δοκιμαστικό σωλήνα των 10 ml. Προστίθενται 0,250 g ασκορβικού οξέος (3.6) και 5 ml αιθανόλης (3.1). Προστίθεται αμμωνία (3.5) μέχρι το pH να γίνει 10 και συμπληρώνεται έως τη χαραγή με αιθανόλη (3.1).

3.11.4. Ζυγίζονται 0,05 g υδροκινονο-μονοβενζυλαιθέρα (3.10) μέσα σε βαθμολογημένο δοκιμαστικό σωλήνα των 10 ml. Προστίθενται 0,250 g ασκορβικού οξέος (3.6) και 5 ml αιθανόλης (3.1). Προστίθεται αμμωνία (3.5) μέχρι το pH να γίνει 10 και συμπληρώνουμε έως τη χαραγή με αιθανόλη (3.1).

3.12. Νιτρικός άργυρος

3.13. 12-μολυβδοφωσφορικό οξύ

3.14. Σιδηροκυανιούχο κάλιο, εξαϋδρικό

3.15. Χλωριούχος σίδηρος, εξαϋδρικός

3.16. Αντιδραστήρια ψεκασμού:

3.16.1. Σε 5 % (m/v) υδατικό διάλυμα νιτρικού αργύρου (3.12) προστίθεται αμμωνία (3.5) μέχρις όπου διαλυθεί το σχηματιζόμενο ίζημα.

Προσοχή: Το διάλυμα καθίσταται εκρηκτικά ασταθές κατά την παραμονή και πρέπει να απορρίπτεται μετά τη χρήση.

3.16.2. 10 % (m/v) διάλυμα 12-μολυβδοφωσφορικού οξέος (3.13) σε αιθανόλη (3.1)

3.16.3. Παρασκευάζεται 1% (m/v) υδατικό διάλυμα σιδηροκυανιούχου καλίου (3.14.) και 2% (m/v) υδατικό διάλυμα χλωριούχου σιδήρου (3.15).

Ίσα μέρη των δύο διαλυμάτων αναμειγνύονται αμέσως πριν τη χρήση.

4. **Εξοπλισμός**

Συνήθης εξοπλισμός εργαστηρίου και:

4.1. Συνήθης εξοπλισμός TLC

4.2. Πλάκες TLC, έτοιμες προς χρήση: silicagel GHR/UV$_{254}$, 20 cm × 20 cm (Machery, Nagel ή ανάλογη), πάχος στοιβάδας 0,25 mm

4.3. Λουτρό υπερήχων

4.4. Φυγόκεντρος

4.5. Λυχνία υπεριώδους φωτός, 254 nm

5. **Διαδικασία**

5.1. Παρασκευή του δείγματος:

Ζυγίζονται 3 γραμμάρια δείγματος μέσα σε βαθμολογημένο σωλήνα των 10 ml. Προστίθενται 250 γραμμάρια ασκορβικού οξέος (3.6) και 5 ml αιθανόλης (3.1). Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 10, με τη βοήθεια αμμωνίας (3.5). Συμπληρώνεται η φιάλη μέχρι τη χαραγή με αιθανόλη (3.1). Κλείνεται ο σωλήνας με πώμα και ομογενοποιείται μέσα σε λουτρό υπερήχων επί 10 λεπτά. Διηθείται μέσω διηθητικού χαρτιού ή γίνεται φυγοκέντρηση σε 3 000 σ.α.λ.

5.2. TLC

5.2.1. Ο θάλαμος χρωματογραφίας κορένυται με διαλύτη ανάπτυξης (3.4).

5.2.2. Τοποθετούνται σε πλάκα 2 μl των διαλυμάτων αναφοράς (3.11) και 2 μl του διαλύματος δείγματος (5.1). Αναπτύσσεται η πλάκα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και σε σκοτάδι μέχρις ότου το μέτωπο του διαλύτη προχωρήσει 15 εκατοστά από την αρχή.

5.2.3. Εξάγεται η πλάκα και ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου.

5.3. Ανίχνευση

5.3.1. Παρατηρούμε την πλάκα κάτω από υπεριώδες φως σε 254 nm και σημειώνουμε τη θέση των κηλίδων.

5.3.2. Ψεκάζεται η πλάκα με:

— αντιδραστήριο νιτρικού αργύρου (3.16.1) ή

— αντιδραστήριο 12-μολυβδοφωσφορικού οξέος (3.16.2) και θερμαίνεται σε περίπου 120 °C ή

— διάλυμα σιδηροκυανιούχου καλίου και διάλυμα χλωριούχου σιδήρου (3.16.3).

6. **Ποιοτικός προσδιορισμός**

Υπολογίζεται η τιμή Rf για κάθε κηλίδα.

Συγκρίνονται οι κηλίδες του δείγματος με εκείνες που λαμβάνονται για τα διαλύματα αναφοράς, ως προς το Rf, το χρώμα των κηλίδων κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία και το χρώμα των κηλίδων μετά τον ψεκασμό με τα αντιδραστήρια ψεκασμού.

Εκτελείται η HPLC που περιγράφεται στο επόμενο κεφάλαιο Β και συγκρίνονται οι χρόνοι κατακράτησης που λαμβάνονται για το δείγμα με εκείνους που λαμβάνονται για τα διαλύματα αναφοράς.

Συνδυάζονται τα αποτελέσματα από τη TLC και την HPLC για να διαπιστωθεί η παρουσία της υδροκινόνης ή των αιθέρων της.

7. **Παρατηρήσεις**

Κάτω από τις συνθήκες που περιγράφηκαν, παρατηρήθηκαν οι ακόλουθες τιμές Rf:

υδροκινόνη:	0,32
υδροκινονο-μονομεθυλαιθέρας:	0,53
υδροκινονο-μονοαιθυλαιθέρας:	0,55
υδροκινονο-μονοβενζυλαιθέρας:	0,58.

B. ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

1. **Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής**

Η μέθοδος αυτή καθορίζει μια διαδικασία για τον ποσοτικό προσδιορισμό της υδροκινόνης, του υδροκινονο-μονομεθυλαιθέρα, του υδροκινονο-μονοαιθυλαιθέρα και του υδροκινονο-μονοβενζυλαιθέρα στα καλλυντικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται για τη λεύκανση του δέρματος.

2. **Αρχή**

Το δείγμα εκχυλίζεται με μείγμα νερού και μεθανόλης ύστερα από ελαφρά θέρμανση για την τήξη των λιπιδίων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανιχνευόμενων ουσιών στο προκύπτον διάλυμα διενεργείται με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και ανιχνευτή υπεριώδους μήκους κύματος.

3. **Αντιδραστήρια**

3.1. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να είναι αναλυτικής καθαρότητας. Το χρησιμοποιούμενο νερό πρέπει να είναι απεσταγμένο ή νερό τουλάχιστον ισοδύναμης καθαρότητας.

3.2. Μεθανόλη

3.3. Υδροκινόνη

3.4. Υδροκινονο-μονομεθυλαιθέρας

3.5. Υδροκινονο-μονοαιθυλαιθέρας

3.6. Υδροκινονο-μονοβενζυλαιθέρας (Μονοβενζόνη)

3.7. Τετραϋδροφουράνιο, καθαρότητας HPLC

3.8. Μείγμα νερού/μεθανόλης 1:1 (v/v). Αναμειγνύονται ένας όγκος νερού και ένας όγκος μεθανόλης (3.2).

3.9. Κινητή φάση: μείγμα τετραϋδροφουρανίου/νερού 45:55 (v/v).

Αναμειγνύονται 45 όγκοι τετραϋδροφουρανίου (3.7) και 55 όγκοι νερού.

3.10. Διάλυμα αναφοράς

Ζυγίζονται με ακρίβεια περίπου 0,06 g υδροκινόνης (3.3), 0,08 g υδροκινονο-μονομεθυλαιθέρα (3.4), 0,10 g υδροκινονομονοαιθυλαιθέρα (3.5) και 0,12 g υδροκινονο-μονοβενζυλαιθέρα (3.6) μέσα σε ογκομετρική φιάλη των 50 ml. Διαλύουμε τα παραπάνω και συμπληρώνουμε έως τη χαραγή με μεθανόλη (3.2). Το διάλυμα αναφοράς παρασκευάζεται με αραίωση 10,00 ml του παραπάνω διαλύματος μέχρι τα 50,00 ml με μείγμα νερού/μεθανόλης (3.8). Τα διαλύματα αυτά πρέπει να έχουν παρασκευασθεί πρόσφατα.

4. **Εξοπλισμός**

Συνήθης εξοπλισμός εργαστηρίου και:

4.1. Υδατόλουτρο, με δυνατότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας στους 60 °C

4.2. Υγρός χρωματογράφος υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους φωτός μεταβλητού μήκους κύματος και βρόχος έγχυσης 10 μl

4.3. Στήλη:

Στήλη χρωματογραφίας από ανοξείδωτο χάλυβα, μήκους 250 m, εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm, που έχει πληρωθεί με φαινύλιο Zorbax με σωματίδια μεγέθους 6 μm, ή ισοδύναμο (υλικό πληρώσεως:

φαινυλοαιθυλοσιλάνιο χημικά δεσμευμένο σε Zorbax Sil και εξωτερικά καλυμμένο με τριμεθυλοχλωροσιλάνιο) να μη χρησιμοποιείτε άλλη προστήλη εκτός από προστήλη φαινυλίου ή ισοδύναμη.

4.4. Διηθητικό χαρτί διαμέτρου 90 mm, Schleicher & Schull, Weissband αριθ. 5892 ή ισοδύναμο

5. **Διαδικασία**

5.1. Παρασκευή δείγματος

Ζυγίζονται με ακρίβεια τριών δεκαδικών ψηφίων 1 g ± 0,1 g (a γραμμάρια) δείγματος μέσα σε ογκομετρικη φιάλη των 50 ml. Διαλύεται το δείγμα με 25 ml μείγμα νερού/μεθανόλης (3.8). Κλείνεται η φιάλη και ανακινείται ζωηρά μέχρι να ληφθεί ομογενές εναιώρημα. Ανακινείται για τουλάχιστον ένα λεπτό. Τοποθετείται η ογκομετρική φιάλη σε υδατόλουτρο (4.1) ρυθμισμένο στους 60 °C για την ενίσχυση της εκχύλισης. Κατόπιν η φιάλη ψύχεται και συμπληρώνεται ο υπόλοιπος όγκος έως τη χαραγή με νερό/μεθανόλη (3.8). Διηθείται το εκχύλισμα με τη βοήθεια διηθητικού χαρτιού (4.4).

Ο προσδιορισμός με την HPLC πρέπει να πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών από την παρασκευή του εκχυλίσματος.

5.2. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

5.2.1. Ρυθμίζεται η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (3.9) στο 1,0 ml/min και το μήκος κύματος του ανιχνευτή στα 295 nm.

5.2.2. Εισάγονται με ένεση 10 μl του διαλύματος δείγματος που λαμβάνεται όπως περιγράφηκε στο σημείο 5.1 και λαμβάνεται το χρωματογράφημα.

Μετρώνται τα εμβαδά των κορυφών. Εκτελείται βαθμονόμηση όπως περιγράφεται στο σημείο 5.2.3. Συγκρίνονται τα χρωματογραφήματα που λαμβάνονται για τα διαλύματα δείγματος και για τα πρότυπα διαλύματα. Χρησιμοποιούνται τα εμβαδά των κορυφών και οι συντελεστές απόκρισης (RF) που υπολογίζονται στο σημείο 5.2.3 για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ανιχνευόμενων ουσιών στο διάλυμα δείγματος.

5.2.3. Βαθμονόμηση

Εισάγονται με ένεση 10 μl του προτύπου διαλύματος (3.10) και καταγράφεται το χρωματογράφημα. Επαναλαμβάνεται η ένεση αρκετές φορές μέχρις ότου ληφθεί σταθερό εμβαδόν κορυφής.

Προσδιορίζεται ο συντελεστής απόκρισης RF_i:

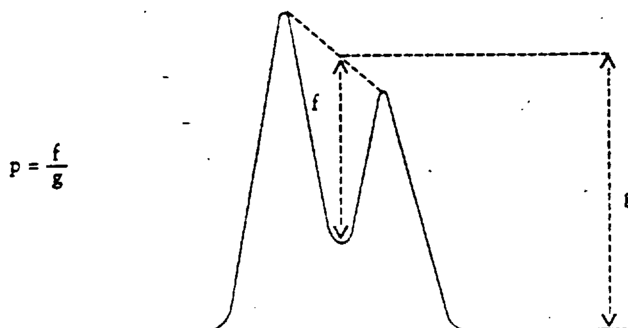
$$RF_i = \frac{p_i}{c_i}$$

p_i = εμβαδόν κορυφής για την υδροκινόνη, τον υδροκινονομονομεθυλαιθέρα, τον υδροκινονομονοαιθυλαιθέρα ή τον υδροκινονομονοβενζυλαιθέρα,

c_i = συγκέντρωση (g/50 ml) στο διάλυμα αναφοράς (3.10) της υδροκινόνης, του υδροκινονομονομεθυλαιθέρα, του υδροκινονομονοαιθυλαιθέρα ή του υδροκινονομονοβενζυλαιθέρα αντίστοιχα.

Εξακριβώνουμε ότι τα χρωματογραφήματα που λαμβάνουμε για ένα πρότυπο διάλυμα και για το δείγμα, ανταποκρίνονται στις ακόλουθες απαιτήσεις:

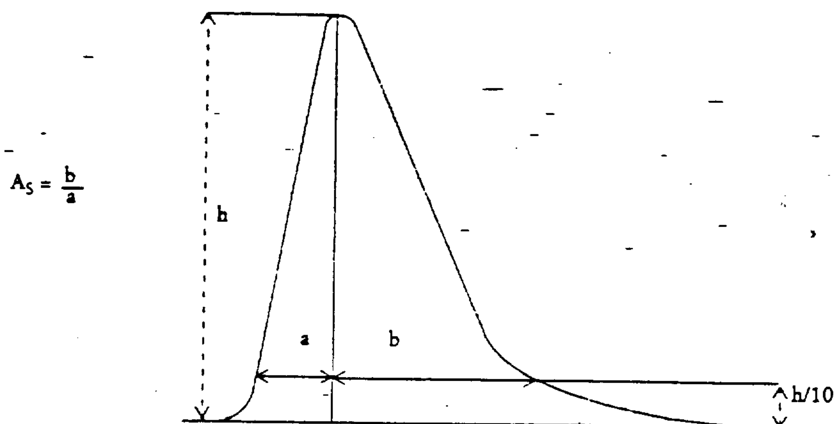
— ο διαχωρισμός των κορυφών του λιγότερο διαχωριζόμενου ζεύγους κορυφών υπερβαίνει το 0,90. Για τον ορισμό του διαχωρισμού των κορυφών, βλέπε σχήμα 1.



Σχήμα 1: Διαχωρισμός κορυφών

Αν δεν επιτευχθεί ο απαιτούμενος διαχωρισμός, είτε πρέπει να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικότερη στήλη, είτε να ρυθμίζεται η σύνθεση της κινητής φάσης μέχρις ότου ικανοποιηθεί η απαίτηση αυτή.

— ο συντελεστής ασυμμετρίας S_t όλων των λαμβανόμενων κορυφών βρίσκεται στο διάστημα 0.9 με 1.5 (για τον ορισμό του συντελεστή ασυμμετρίας κορυφών, βλέπε σχήμα 2). Για την καταγραφή του χρωματογραφήματος για τον προσδιορισμό του συντελεστή ασυμμετρίας, συνιστάται ταχύτητα χαρτιού τουλάχιστον 2 cm/min.



Σχήμα 2: **Συντελεστής ασυμμετρίας κορυφών**

— λαμβάνουμε σταθερή γραμμή βάσης.

6. **Υπολογισμός**

Χρησιμοποιούνται τα εμβαδά των κορυφών της ανιχνευόμενης ουσίας για τον υπολογισμό της (των) συγκέντρωσης(εων) του (των) ανιχνευόμενης(ων) ουσίας(ών) στο δείγμα. Υπολογίζεται η συγκέντρωση της ανιχνευόμενης ουσίας στο δείγμα ως ποσοστό επί τοις εκατό κατά μάζα (X_i) από τον τύπο:

$$x_i \,\%\, (m/m) = \frac{b_i \cdot 100}{RF_i \cdot a}$$

a = μάζα του δείγματος σε g,

b_i = εμβαδόν κορυφής της ανιχνευόμενης ουσίας στο δείγμα,

RF_i = συντελεστής απόκρισης (5.2.3).

7. **Επαναληψιμότητα** (¹)

7.1. Για περιεκτικότητα σε υδροκινόνη 2.0 % η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελούνται παράλληλα στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει σε απόλυτη τιμή το 0,13 %.

7.2. Για περιεκτικότητα σε υδροκινονο-μονομεθυλαιθέρα 1.0 % η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελούνται παράλληλα στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει σε απόλυτη τιμή το 0,1 %.

7.3. Για περιεκτικότητα σε υδροκινονο-μονοαιθυλαιθέρα 1.0 % η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελούνται παράλληλα στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει σε απόλυτη τιμή το 0.11 %.

7.4. Για περιεκτικότητα σε υδροκινονο-μονοβενζυλαιθέρα 1.0 % η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελούνται παράλληλα στο ίδιο δείγμα δεν πρέπει να υπερβαίνει σε απόλυτη τιμή το 0.11 %.

8. **Αναπαραγωγιμότητα** (¹)

8.1. Για περιεκτικότητα σε υδροκινόνη 2.0 % η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελούνται στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικά εργαστήρια, διαφορετικοί αναλυτές, διαφορετικός εξοπλισμός ή/και διαφορετικός χρόνος) δεν πρέπει να υπερβαίνει σε απόλυτη τιμή το 0.37 %.

(¹) ISO 5725.

8.2. Για περιεκτικότητα σε υδροκινονο-μονομεθυλαιθέρα 1,0 % η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελούνται στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικά εργαστήρια, διαφορετικοί αναλυτές, διαφορετικός εξοπλισμός ή/και διαφορετικός χρόνος) δεν πρέπει να υπερβαίνει σε απόλυτη τιμή το 0,21 %.

8.3. Για περιεκτικότητα σε υδροκινονο-μονοαιθυλαιθέρα 1,0 % η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελούνται στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικά εργαστήρια, διαφορετικοί αναλυτές, διαφορετικός εξοπλισμός ή/και διαφορετικός χρόνος) δεν πρέπει να υπερβαίνει σε απόλυτη τιμή το 0,19 %.

8.4. Για περιεκτικότητα σε υδροκινονο-μονοβενζυλαιθέρα 1,0 % η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δύο προσδιορισμών που εκτελούνται στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικά εργαστήρια, διαφορετικοί αναλυτές, διαφορετικός εξοπλισμός ή/και διαφορετικός χρόνος) δεν πρέπει να υπερβαίνει σε απόλυτη τιμή το 0,11 %.

9. **Παρατηρήσεις**

Όταν βρεθεί περιεκτικότητα σε υδροκινόνη σημαντικά μεγαλύτερη από 2 % και απαιτείται ακριβής εκτίμηση της περιεκτικότητας το εκχύλισμα δείγματος (5.1) πρέπει να αραιωθεί σε συγκέντρωση παρόμοια με αυτή που θα λαμβανόταν από δείγμα που περιέχει 2 % υδροκινόνη, και ο προσδιορισμός πρέπει να επαναληφθεί. (Σε ορισμένα όργανα η απορρόφηση μπορεί να βρίσκεται εκτός του εύρους γραμμικότητας του ανιχνευτή για υψηλές συγκεντρώσεις υδροκινόνης).

9.2. Παρεμβολές

Με τη μέθοδο που περιγράφεται παραπάνω προσδιορίζουμε ποσοτικά την υδροκινόνη και τους αιθέρες της σε μια μόνον ισοκρατική εφαρμογή. Η χρήση της στήλης φαινυλίου εξασφαλίζει επαρκή κατακράτηση για την υδροκινόνη, η οποία δεν μπορεί να εξασφαλιστεί όταν χρησιμοποιείται στήλη C18 με την περιγραφόμενη κινητή φάση. Η μέθοδος αυτή, ωστόσο, είναι επιρρεπής σε παρεμβολές από μια σειρά ενώσεων τύπου parabens. Στην περίπτωση αυτή ο προσδιορισμός πρέπει να επαναληφθεί χρησιμοποιώντας ένα διαφορετικό σύστημα κινητής φάσης/ακίνητης φάσης. Κατάλληλες μέθοδοι μπορούν να βρεθούν στις αναφορές (1) και (2) και συγκεκριμένα:

Στήλη: Zorbax » DS, 4,6 mm × 25 cm ή ισοδύναμη

Θερμοκρασία: 36 °C

Ροή: 1,5 ml/min

Κινητή φάση: για την υδροκινόνη: μεθανόλη/νερό 5/95 (v/v),

για τον υδροκινονο-μονομεθυλαιθέρα: μεθανόλη/νερό 30/70 (v/v),

για τον υδροκινονο-μονοβενζυλαιθέρα: μεθανόλη/νερό 80/20 (v/v) (1).

Στήλη: Spherisorb S5-ODS ή ισοδύναμη

Κινητή φάση: νερό/μεθανόλη 90:10 (v/v)

Ροή: 1,5 ml/min

Οι συνθήκες αυτές είναι κατάλληλες για την υδροκινόνη (2).

---

(1) M. Herpol-Borremans et M.O. Masse. Identification et dosage de l'hydroquinone et ses éthers méthylique et benzylique dans les produits cosmetiques pour blanchir la peau. Int. J. Cosmet. Sci 8-203-214 (1986).
(2) J. Firth and I. Rix. Determination of Hydroquinone in skin toning creams. Analyst (1986). 111. p. 129.